



CRIOPRESEVAÇÃO DE EIXO EMBRIONÁRIO DE ZIGÓTICOS DE PINHÃO MANSO

Maria do Socorro Rocha¹, Napoleão Esberard de M. Beltrão², Francisco de Assis C. Almeida³, Ailton Melo de Moraes³, Maria Sueli Rocha Lima¹

¹ UFPB, marialirium@hotmail.com, ² Embrapa Algodão, napoleão@cnpa.embrapa.br, ³ UFCG

RESUMO – O objetivo deste trabalho é avaliar um protocolo para criopreservação de eixos embrionários do pinhão manso, como alternativa para a manutenção dos recursos genéticos da espécie. Foram utilizadas sementes de pinhão manso dos acessos Garanhuns-PB e Itaporanga – PB, com germinação em torno de 94%, teores de água ajustados para 6 a 8%. Procedido a sua esterilização foram mantidas em embebição em água por 24 horas para posterior excisão dos eixos embrionários em câmara de fluxo laminar, onde permaneceram em dessecação por 0, 28, 48 e 88 minutos para em seguida serem submetidos a criopreservação, por meio da imersão direta em nitrogênio líquido (-196°C), durante 0, 7, 28 e 60 dias. A reativação dos eixos embrionários foi realizada a cada período de armazenamento, após sua retirada e descongelamento em condições de ambiente, durante 48 minutos, sendo cultivados em meio MS sob condições de câmara regulada a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Aos 28 dias de cultivo, foram realizadas avaliações da regeneração, comprimento de plântulas e números de raízes emitidas. Procedeu-se análise de variância e regressão polinomial dos dados obtidos, para cada cultivar, em função do período de dessecação e armazenamento. O teor de água limite recomendado para a criopreservação de eixos embrionários de pinhão manso está entre 9 e 16% com base no peso fresco; eixos embrionários do pinhão manso devem ser dessecados para teor de água inferior a 16% para assegurar um ótimo de regeneração *in vitro*, após imersão em nitrogênio líquido; eixos embrionários de Pinhão manso, com teor de água em torno de 9,7%, podem ser conservados em bancos de germoplasma em condições criogênicas e regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro* após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Palavras-chave – recursos genéticos, eixos embrionários, cultura de tecido.

INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) poderá ser uma das culturas importante para exploração no Brasil e no mundo, apresentando-se como ótimo fornecedor de óleo para a indústria, entre outros subprodutos gerando emprego e renda ao longo de sua cadeia produtiva.

A conservação dos recursos genéticos implica na manutenção de coleções *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*; neste caso, podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões





ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado: no campo ou em casa de vegetação, em câmara seca sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina, ou criopreservadas (VALOIS, 1998).

A criopreservação, manutenção de material biológico sob temperaturas ultra-reduzidas (nitrogênio líquido, -196°C), tem garantido conservação por períodos indefinidos, por reduzir muito ou praticamente paralisar qualquer atividade a nível celular, minimizando a deterioração biológica durante o armazenamento (PRITCHARD, 1995).

Embriões zigóticos são sistemas de tecidos simples, altamente organizados, que podem ser usados para produzir uma planta completa. E são apropriados para ajudar a reduzir o risco de variação somaclonal em cultura que outros métodos de regeneração de plantas *in vitro*; ademais, embriões zigóticos são usado com sucesso para criopreservação do germoplasma de muitas espécies vegetais que possuem sementes recalcitrantes, intermediárias ou com problemas no armazenamento (BERJAK *et al.*, 2000).

Considerando-se a importância de ser empregar eixos embrionários zigóticos como elemento de preservação de germoplasma do pinhão manso foi realizado este trabalho com o objetivo de desenvolver um protocolo para a criopreservação de eixos embrionários de pinhão manso como alternativa para a conservação dos recursos genéticos da espécie.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da EMEPA em João Pessoa, PB. Utilizaram-se sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), acessos Garanhuns – PE e Itaporanga – PB, colhidas em campos de produção da em Pernambuco e Paraíba, na safra 2008.

A caracterização da viabilidade inicial das sementes, revelou germinação em torno de 94%. O teor de umidade permitido para a criopreservação 6 a 8% b.u. para promover a perda ou o ganho de água. Procedeu-se à esterilização das sementes em solução de hipoclorito de sódio comercial (Brilux) a 80% (v/v), com 2,0 a 2,5% de cloro ativo, acrescida com 1 a 2 gotas de polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20®), sob agitação durante 20 minutos, seguida de triplice lavagem em água bidestilada esterilizada.

Após esterilização, as sementes permaneceram em embebição durante 24 horas, em água bidestilada esterilizada e foram então levadas para excisão de seus eixos embrionários na câmara de





fluxo laminar, onde foram submetidos a dessecação por 0, 28, 48 e 88 minutos, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sendo, em seguida, colocados em recipientes estéreis de polipropileno de 4,5 mL, em número de quatro réplicas de 10 eixos embrionários por frasco e imersos diretamente no nitrogênio líquido a -196°C , onde permaneceram 0, 7, 28 e 60 dias. Após cada período de dessecação, separaram-se três repetições de 30 eixos embrionários para a determinação do teor de água, no momento de sua criopreservação, por meio da pesagem e secagem em estufa regulada a $03 \pm 2^\circ\text{C}$ por 17 horas, conforme recomendado pela International Seed Testing Association (ISTA, 1985). O teor de água foi expresso em porcentagem, com base no peso fresco.

Após cada período de criopreservação, criotubos contendo os eixos embrionários foram retirados e postos para descongelar, sob temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 60 minutos; posteriormente, eixos embrionários foram cultivados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), devidamente vedados e mantidos em câmara de crescimento regulada a temperatura de 25°C , fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro) e intensidade luminosa em torno $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas frias. As avaliações foram realizadas no 28º dia após cultivo, mediante a porcentagem de regeneração, a mensuração do comprimento de plântulas e contagem do número de raízes emitidas.

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 4 \times 4$, sendo dois acessos (Garanhuns – PE e Itaporanga – PB), quatro tempos de dessecação (0, 28, 48 e 88 minutos) e quatro períodos de armazenamento dos eixos embrionários (0, 7, 28 e 60 dias) com 10 repetições com um explante por tubo, procedendo-se à análise de variância e regressão polinomial, para cada acesso, em função do tempo de dessecação e do período de armazenamento. Antes da análise, os dados referentes ao comprimento de plântulas foram transformados para $\sqrt{X+1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sementes de pinhão manso dos acessos Garanhuns e Itaporanga com umidade entre 6 e 8%, foram submetidas a embebição, por 24 horas, e apresentaram eixos embrionários com teor de água médio de 53%, após excisão (Figura 2 A e B). Quando os eixos embrionários foram submetidos a dessecação em câmara de fluxo laminar, ocorreu redução do teor de água em valores médios na Tabela 2, para ambos os acessos, na ordem de 24, 16 e 9,7%, após 28, 48 e 88 minutos de dessecação, respectivamente. A redução de água dos eixos embrionários a um nível possível





submetê-lo a temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo é o passo mais crítico na obtenção de um protocolo viável de criopreservação. Isto é confirmado por Santos et al. (2002), esclarecendo ainda que, em geral, as sementes, os embriões e os eixos embrionários se criopreservam prévio a desidratação por ar.

Encontra-se, no Tabela 1, o resumo da análise de variância, que detectou efeitos significativos para a maioria das variáveis estudadas, excetuando a interação dupla entre acessos x armazenamento, na porcentagem de regeneração; a interação dupla entre acessos x dessecação, assim como a interação entre todas as variáveis (acessos x dessecação x armazenamento) no comprimento de plântulas originadas dos eixos embrionários do pinhão manso. Eixos embrionários do pinhão manso do acesso de Garanhuns, submetidos a criopreservação, apresentaram maior regeneração quando comparados com os do acessos Itaporanga, apesar desta superar aquela, no comprimento de plântula e no número de raízes emitidas por seus eixos embrionários (Tabela 2). Estes resultados indicam que as diferenças apresentadas entre acessos e/ou variedades de uma mesma espécie, quando submetidas a criopreservação, se devem, provavelmente, ao patrimônio genético de cada variante, não havendo efeitos da criopreservação sobre a viabilidade e/ou vigor das cultivares estudadas, estando esta afirmação de acordo com Lopes (2005).

Quanto a porcentagem de regeneração de eixos embrionários de pinhão manso dos acessos Garanhuns e Itaporanga, submetidos a criopreservação (Tabela2), houve variação em função da sua permanência sob dessecação em câmara de fluxo laminar e do teor de água, que apresentavam, no momento da criopreservação (Figura 1), de modo que, quanto mais tempo os eixos embrionários permaneceram dessecando, menor foi o seu teor de água e maior sua capacidade de resistir às condições do nitrogênio líquido e regenerar uma plântula normal. Eixos embrionários do pinhão manso com teor de água inferior a 16% (b.u.), valor este atingido após 60 minutos de dessecação, garantiram, em média, regeneração de 75% e 73%, para os acessos Garanhuns e Itaporanga, após criopreservação. Conforme se observa, eixos embrionários do pinhão manso dessecados em câmara de fluxo laminar até teor de água inferior a 16% (b.u.) com boa qualidade fisiológica podem ser criopreservados com segurança, não apresentando problemas no que diz respeito a velocidade de congelamento e descongelamento que venham a prejudicar a sua capacidade de regeneração. A regeneração obtida na ordem de 75 e 73% para os acessos Garanhuns e Itaporanga, respectivamente, dos eixos embrionários com 16% (b.u.) do teor de água após imersão direta no nitrogênio líquido, indicam que a criopreservação pode ser facilmente realizada, mantendo-se a ressalva de que o material criopreservado pode apresentar diferenças no posterior desenvolvimento das plantas. Ante o abordado Lopes et al. (2005), afirma que baixos conteúdos de umidade reduzem a formação de gelo





nas estruturas intracelulares da semente, quando expostas às temperaturas subzero, atenuando assim, possíveis danos decorrentes do congelamento. Santos *et al.* (2002), obtiveram total regeneração (100%) *in vitro* de eixos embrionários de sementes de café com 12,6% de umidade, após congelamento em nitrogênio líquido.

CONCLUSÃO

O teor de água limite recomendado para criopreservação de eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) está entre 9 e 16%;

Eixos embrionários criopreservados com 16% (b.u.) do teor de água, apresentam regeneração de plântula *in vitro* de 70% (Itaporanga) e 78% (Garanhuns);

Eixos embrionários do pinhão manso com umidade em torno de 9,7%, podem regenerar mais de 80% de plântulas *in vitro*, após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D.J.; WESLEY-SMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N.W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Japan/International; Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p.140-155.

ISTA, International rules for seed testing. Seed Science and Technology, Zürich, v.13, n.2, p.299-355, 1985.

LOPES, K. P. Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro. Areia, 2005. 155p. Tese (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias

MURASIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497, 1962.



PRITCHARD, H.W. Cryopreservation of seeds. In: DAY, J.G.; McLELLAN, M.R. Methods in molecular biology: cryopreservation and freezes-drying protocols. Totowa: Humana Press Inc., 1995. v.38, p.133-144.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C. RIBEIRO, F.N.S. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.). Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 69).

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Investigación Agraria, Madrid, n.2, p.249-259, 2000.

VALOIS, A.C.C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual (um depoimento). Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília, v.15, n. especial, p.21-31, 1998.

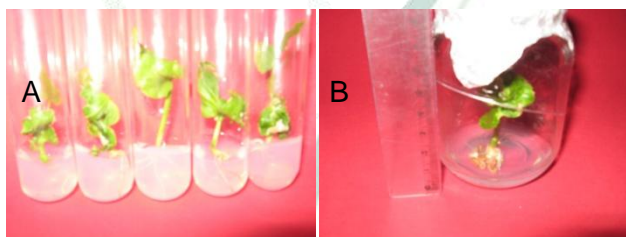


Figura 13 – Regeneração dos eixos embrionário (A) e altura do explante de pinhão manso aos 14 dias ,EMEPA.

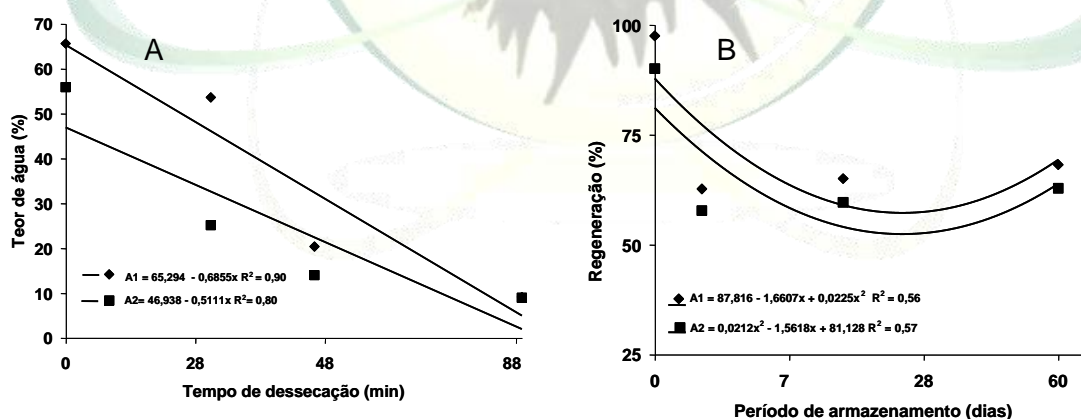


Figura 2 – Teor de água (A), porcentagem de regeneração de eixos embrionários do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) acessos Garanhuns e Itaporanga, em função do tempo de dessecação em câmara de fluxo laminar e sob o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ao 60 dias.



Tabela 1. Resumo da análise de variância da regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de dois acessos do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), submetidos a dessecação e ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios		
		Regeneração (%)	Comprimento de Plântula (cm) ¹	Número de Raízes Emitidas
Acessos (A)	1	1476,96125**	8,11541**	3345,51775**
Dessecação (D)	3	30231,79021**	16,52818**	2361,62810**
Armazenamento (P)	3	9344,93646**	3,65054**	670,46665**
A x D	3	451,22771**	1,70051**	866,16370**
A x P	3	145,08646**	0,33823**	1483,28944**
D x P	9	3409,59625**	2,28787**	418,04134**
A x D x P	9	169,62264**	89,7706**	208,16452**
D/A1	(3)			
Efeito linear	1	6531,9065**	43,83266**	6283,85823**
Efeito quadrático	1	2062,7052**	5,5694**	268,80109**
D/A2	(3)			
Efeito linear	1	1732,1712**	4,61550**	1881,38943**
Efeito quadrático	1	718,8197**	4,98096**	93,5410**
Resíduo	96	10,51495	0,00207	1,35240
Total	31	155218,48875	97,23033	25255,84409
CV (%)		4,75	1,82	5,59

** Significativo a 1% de probabilidade; * Significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} Não significativo; ¹ Dados transformados em $\sqrt{X+1}$





Tabela 2. Valores médios de regeneração, comprimento de plântula e número de raízes emitidas por eixos embrionários de dois acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), submetidos ao armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Acessos	Regeneração (%)	Comprimento de Plântula ¹ (cm)	Número de Raízes Emitidas
Garanhuns	71,60 a	2,73 a	25,91 a
Itaporanga	64,81 b	2,23 b	15,68 b
DMS	1,13	0,015	0,40

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, ¹ Dados transformados em $\sqrt{X + 1}$

